

SUR L'ANALYSE QUALITATIVE DES AGLYCONES FLAVONIQUES DANS UNE OPTIQUE CHIMIOTAXINOMIQUE

MAURICE JAY*, JEAN-FRANÇOIS GONNET*, ECKHARD WOLLENWEBER† et BERNARD VOIRIN*

(Received 4 December 1974)

Key Word Index—Flavonols; flavones; identification; chromatographic separation; spectral data.

Abstract—A qualitative method is described for the analysis of flavonols and flavones in hydrolysed extracts of plant organs; the procedure involves thin layer and column chromatography of plant extracts on polyamide. Physicochemical data are given for about eighty flavonoids.

INTRODUCTION

Il y a une vingtaine d'années, Bate-Smith [1,2] jetait les bases d'une méthode d'analyse des flavonoïdes, reposant sur l'hydrolyse des hétérosides flavoniques naturels et sur la transformation des proanthocyanes en anthocyanidines correspondantes par traitement chlorhydrique à chaud. Une extraction par l'alcool amylique suivie de chromatographie sur papier permettait à l'auteur par simple relevé de R_f et de couleur sous UV de caractériser et d'identifier les phytoconstituants polyphénoliques d'un échantillon végétal.

Ce protocole d'analyse a, dans ses grandes lignes, été repris pour de nombreux travaux chimiotaxinomiques [3-9]; si quelques modifications ont alors été apportées à la technique, elles ne concernent aucune des étapes essentielles: hydrolyse ou papyrographie, mais seulement la phase extractive qui a été rendue plus sélective, et la phase d'identification où les méthodes spectrophotométriques ont été généralisées [10,11]. A la suite de ces travaux, il est clair que la portée taxinomique des résultats flavoniques dépend du niveau systématique de l'échantillonnage; en effet, les meilleures réponses ont été apportées au

niveau des taxa supérieurs: classe, ordre, famille, alors qu'elles sont restées beaucoup plus limitées au niveau des genres, espèces ou sous-espèces. Nous voyons à cela deux raisons essentielles: le fait qu'à ce niveau microsystematique la valeur d'indicateurs taxinomiques des aglycones flavoniques peut être restreinte voire inexistante dans certains cas, et (ou) le fait que les techniques d'analyse de ces aglycones flavoniques et en particulier la papyrographie d'extraits globaux, constituent une approche trop grossière du problème, interdisant en outre d'atteindre le chimisme flavonique mineur dont l'incidence microsystematique peut être très importante.

Dans cette optique, le présent travail se propose de décrire un mode opératoire plus sensible et plus sélectif pour les aglycones flavoniques, basé sur l'emploi conjugué des chromatographies sur colonne et sur couches minces de polyamide, adsorbant dont les possibilités en ce domaine ont été soulignées par Egger *et al.* [12, 13].

PROTOCOLE D'ANALYSE

Extraction des aglycones flavoniques

L'extraction des aglycones flavoniques est conduite selon la technique de Bate-Smith [1, 2], modifiée par Lebreton *et al.* [10]; les principales étapes consistent en l'hydrolyse chlorhydrique à chaud du matériel végétal, et en l'épuisement successif de la phase aqueuse hydrolytique par Et_2O

* Service de Phytochimie, Département de Biologie Végétale U.E.R. des Sciences de la Nature, Université Cl. Bernard Lyon I 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69621 Villeurbanne, France.

† Botanisches Institut der Technischen Hochschule D-6100 Darmstadt, Deutschland.

(flavonols, flavones, etc.) et par *n*-BuOH (C-glycoflavones, anthocyanidines, etc.).

Chromatographie exploratoire des aglycones flavoniques sur couches minces

Le but de cette opération n'est pas de conduire à une identification structurale des individualités polyphénoliques, mais plus simplement de permettre une première approche de la composition flavonique de l'échantillon: nombre de composés, classes chimiques etc. L'adsorbant utilisé est le polyamide, quant aux mélanges solvants, ils sont à base de C₆H₆, MeCOEt, MeOH, Petrol, CHCl₃. Cette étape comparable à la CP analytique s'est révélée nettement plus sélective que cette dernière comme le soulignent les exemples suivants.

Chez *Anthyllis vulneraria* (Papilionacées) [14], le mélange solvant: C₆H₆-MeCOEt-MeOH (4-3-3), permet de séparer avec netteté l'isorhamnétine (tétraOH-3,4',5,7 monoOMe-3' flavone) du kaempférol (tétraOH-3,4',5,7 flavone), deux flavonols difficiles à séparer en CP; de même apparaissent très distincts la fisétine (tétraOH-3,3',4',7 flavone), le géraldol (triOH-3,4',7 monoOMe-3' flavone) et la triOH-3,4',7 flavone (désoxy-5 kaempférol), c'est à dire trois désoxy-5 flavonols qui en CP viennent se confondre avec le kaempférol.

Dans le cas de *Chrysosplenium alternifolium* (Saxifragacées), à l'aide du mélange solvant C₆H₆-Petrol-MeCOEt-MeOH (60-26-7-7) [15], quatre polyméthoxyflavonols sont individualisés: tétraOH-3',4',5,6 diOMe-3,7 flavone (*R_f* 0,05), triOH-3',4',5 triOMe-3,6,7 flavone (0,10), diOH-4',5 triOMe-3,6,7 flavone (0,30) et diOH-4',5 tétraOMe-3,3',6,7 flavone (0,50); en CP, seul le premier composé est nettement séparé (*R_f* 0,53 in AcOH 60%, et *R_f* 0,66 in BAW-415), les trois autres sont confondus en une seule tache de *R_f* 0,8-0,9 selon le système solvant choisi.

Chromatographie préparative sur colonne

Son but est double: parfaire la sélectivité et accéder à la pureté chromatographique des produits isolés. L'opération consiste à placer un extrait flavonique brut au sommet d'une colonne de polyamide et à procéder à l'élution des différents phytoconstituants par des mélanges solvant de polarité croissante. Cette phase préparative s.s. est suivie du contrôle des fractions col-

lectées, par CCM de polyamide; celui-ci permet d'apprécier le degré de pureté des fractions et de ce fait dicte l'arrêt ou la poursuite des chromatographies (l'expérimentateur devra alors jouer sur la force du gradient d'élution, sur la hauteur de la colonne d'adsorbant).

La nécessité de cette étape préparative est démontrée dans l'exemple suivant: chez *Dryas octopetala* (Rosacées) [16], dans les meilleures conditions, la CCM exploratoire permet de visualiser quatre taches correspondant respectivement à la quercétine (pentaOH-3,3',4',5,7 flavone), au kaempférol, à la corniculatusine (pentaOH-3,3',4',5,7 monoOMe-8 flavone) et à la sexangularétine (tétraOH-3,4',5,7 monoOMe-8 flavone); le même extrait flavonique, après chromatographie préparative sur colonne de polyamide montre lors de la CCM de contrôle sept flavonols au lieu de quatre: quercétine, kaempférol, corniculatusine, sexangularétine et isorhamnétine, limocitrine (triOH-3,4',5 diOMe-3',8 flavone), gossypétine (hexaOH-3,3',4',5,7,8 flavone); du fait de sa très faible teneur la limocitrine était passée inaperçue lors de la chromatographie exploratoire; quant à l'isorhamnétine et à la gossypétine, elles se trouvaient masquées respectivement par la corniculatusine et la quercétine.

Identification des aglycones flavoniques

Notre protocole expérimental conduit à l'obtention de produits chromatographiquement très purs et de ce fait facilement cristallisables même dans le cas de microquantités. Un tel résultat permet dès lors la mise en oeuvre, dans les meilleures conditions, des méthodes modernes d'identification structurale des flavonoïdes: spectrophotométrie UV, IR, spectrométrie de masse et de RMN. Dans la plupart des cas, le diagnostic est assuré par l'analyse du comportement chromatographique, des tracés spectraux UV en présence de réactifs et du spectre de masse; la RMN, technique d'ailleurs plus coûteuse en matériel (2-3 mg), n'est mise en oeuvre que pour les structures complexes et les structures originales.

Notre propos n'est pas ici de donner les règles spectrales relatives à ces diverses méthodes qui ont fait l'objet de plusieurs mises au point [17-23], mais simplement d'insister, d'une part sur le caractère indispensable de ces épreuves physiques qui seules peuvent garantir l'identification

structurale des flavonoïdes, et d'autre part sur la qualité des tracés spectraux obtenus lorsque ces techniques sont appliquées aux produits isolés par chromatographie sur polyamide.

Remarques

Proanthocyanes et C-glycoflavones. Lorsque le matériel végétal contient des proanthocyanes, ces dernières, après traitement chlorhydrique à chaud, se retrouvent dans la phase aqueuse sous

forme d'anthocyanidines colorées qu'il est aisé d'extraire par le *n*-BuOH et assez facile d'identifier dans la majorité des cas par simple relevé de R_f et de couleur après migration dans le solvant Forestal [10].

Si les proanthocyanes sont absentes, il est tout aussi nécessaire de compléter l'extraction de la phase aqueuse hydrolytique par le *n*-BuOH, et de contrôler par spectrophotométrie et par chromatographie cet extrait BuOH qui peut contenir

Tableau 1. Constantes chromatographiques de 49 flavonols et de 37 flavones

	1	2	$R_f \times 100^\dagger$		5	6	Couleur sous UV en CCM polyamide†
	3	4					
FLAVONOLS*							
<i>Type myricétine</i>							
Myricétine: hexaOH-3,3',4',5,5',7 flavone	20	29	45	40	15	00	J
Désoxy-5 myricétine (robinétine)	33	38	46	38	15	00	J-b
MonoMe-3 myricétine*	49	61	75	65	25	00	V
MonoMe-4' myricétine (méarnsétine)*	44	57	80	65	35	00	J
DiMe-3',5' myricétine (syringétine)*	57	74	85	72	75	10	J
TriMe-3',4',7 myricétine*	62	82	88	78	80	35	J
<i>Type quercétine</i>							
Quercétine: pentaOH-3,3',4',5,7 flavone	33	42	73	57	20	00	J
Désoxy-5 quercétine (fisétine)	42	53	71	59	20	00	J-b
MonoMe-3 quercétine	63	76	87	82	40	00	V
MonoMe-3' quercétine (isorhamnétine)	37	53	73	68	40	00	J
Désoxy-5 isorhamnétine (géraldol)*	48	65	83	67	45	00	J-b
MonoMe-4' quercétine (tamarixétine)*	42	58	79	67	45	00	J
MonoMe-5 quercétine (azaléatine)*	40	55	67	54	20	00	J-b
MonoMe-7 quercétine (rhamnétine)*	55	55	77	63	45	00	J
DiMe-3,7 quercétine*	74	86	90	85	65	10	V
DiMe-4',7 quercétine (ombuine)*	60	76	86	75	65	25	J
TriMe-3,4',7 quercétine*	82	91	93	88	80	55	V
TriMe-3',4',7 quercétine*	64	84	88	78	85	65	J
TétraMe-3,3',4',7 quercétine*	85	93	51	88	90	80	V
Quercétagétine: OH-6 quercétine*	18	25	37	23	10	00	V-Br
MonoMe-6 quercétagétine (patulétine)	42	54	75	64	30	00	J-Br
DiMe-3,7 quercétagétine*	53	74	66	56	60	05	V
TriMe-3,3',6 quercétagétine (jacéidine)	76	87	91	83	80	10	V
TriMe-3,4',6 quercétagétine (centauréidine)*	79	89	90	83	80	10	V
TriMe-3,6,7 quercétagétine*	77	88	88	80	80	10	V
TétraMe-3,3',6,7 quercétagétine (chrysosplénétine)*	85	92	90	83	90	50	V
Gossypétine: OH-8 quercétine	18	24	35	24	10	00	V-Br
MonoMe-8 gossypétine (corniculatusine)*	33	43	67	55	40	00	J-Br
DiMe-3',8 gossypétine (limocitrine)*	38	58	75	56	65	10	J-Br
<i>Type kaempférol</i>							
Kaempférol: tétraOH-3,4',5,7 flavone	46	59	87	79	35	00	J
Désoxy-5 kaempférol*	47	66	86	75	40	00	J-b
MonoOH-2' kaempférol (morine)	63	76	94	84	05	00	J-Br
MonoMe-3 kaempférol*	71	87	92	89	55	05	V
MonoMe-4' kaempférol (kaempféride)	54	70	88	86	55	10	J
MonoMe-7 kaempférol (rhamnocitrine)*	55	67	90	82	60	15	J
DiMe-3,4' kaempférol (ermanine)*	78	90	94	86	75	30	V
DiMe-4',7 kaempférol*	67	87	92	87	75	70	J
TriMe-3,4',7 kaempférol*	83	93	93	92	85	80	V
MonoOMe-6 kaempférol*	55	74	85	77	50	00	J-Br

Tableau 1. *continued*

	1	2	$R_f \times 100^\dagger$		5	6	Couleur sous UV en CCM polyamide‡
	3	4					
MonoOMe-6 monoMe-3 kaempférol*	75	88	92	86	75	10	V
MonoOMe-6 monoMe-4' kaempférol (bétulétole)*	66	86	91	82	70	20	J-Br
MonoOMe-6 monoMe-7 kaempférol (eupalitine)*	67	81	88	81	70	15	J-Br
MonoOMe-6 diMe-3,4' kaempférol*	76	88	92	87	70	05	V
MonoOMe-6 diMe-3,7 kaempférol (pendulétine)	84	91	91	86	85	35	V
Herbacétine: OH-8 kaempférol*	30	43	61	48	20	00	V-Br
MonoMe-8 herbacétine (sexangularétine)	50	56	84	77	50	00	J-Br
<i>Type galangine</i>							
Galangine: triOH-3,5,7 flavone	61	77	94	88	65	15	J-Br
MonoOH-2' galangine (datiscétine)*	77	82	93	93	05	00	O
MonoMe-3 galangine	75	92	96	92	75	35	V
FLAVONES							
<i>Type lutéoline</i>							
Lutéoline: tétraOH-3',4',5,7 flavone	53	66	79	78	25	00	V
MonoMe-3' lutéoline (chrysoériol)	62	78	87	78	45	05	V
MonoMe-4' lutéoline (diosmétine)	60	80	86	79	45	05	V
DiMe-4',7 lutéoline*	70	84	88	80	70	30	V
MonoOH-6 lutéoline*	34	49	46	35	10	00	V
MonoOMe-6 diMe-3',7 lutéoline*	80	88	88	76	80	45	V
MonoOH-8 lutéoline (hypolaétine)*	39	52	50	53	15	00	V-Br
<i>Type apigénine</i>							
Apigénine: triOH-4',5,7 flavone	61	81	91	86	45	00	V
MonoMe-4' apigénine (acacétine)	77	89	91	88	60	15	V
MonoMe-5 apigénine*	65	80	88	77	40	00	Bl-c
MonoMe-7 apigénine (genkwanine)*	73	86	96	86	60	20	V
DiMe-4',7 apigénine*	78	92	94	89	80	70	V
Scutellaréine: OH-6 apigénine*	45	60	70	60	25	00	V
DiMe-4',6 scutellaréine (pectolinarigénine)*	75	91	92	86	75	30	V
TriMe-4',6,7 scutellaréine (salvigénine)*	84	94	94	87	85	75	V
Isoscutellaréine: OH-8 apigénine*	50	65	77	72	30	00	V
<i>Type chrysine</i>							
Chrysine: diOH-5,7 flavone	72	89	90	87	60	20	V
MonoMe-7 chrysine (tectochrysine)	79	96	96	91	85	75	V
MonoOMe-8 chrysine (wogonine)*	83	91	95	93	80	35	V
MonoOMe-6 diMe-5,7 chrysine*	92	92	92	90	90	75	J-Ve
DiOMe-6,8 diMe-5,7 chrysine*	92	92	93	89	90	85	O
C-Me-6 chrysine	75	92	96	90	65	20	V
<i>Autres Flavones</i>							
Flavone	82	92	94	91	85	75	V
MonoOH-2' flavone*	85	94	93	89	70	20	Bl-c
MonoOH-4' flavone*	79	92	93	87	75	20	Bl
MonoOMe-4' flavone	85	93	93	90	90	70	J-R
MonoOH-5 flavone	87	95	96	90	90	90	V
MonoOH-7 flavone	80	94	93	89	70	20	J-Ve
DiOH-2',5 flavone*	82	91	84	90	65	20	V
DiOH-3',4' flavone	72	83	88	80	55	05	Bl-c
DiOH-5,6 flavone*	81	84	94	89	80	40	V
DiOH-5,8 flavone (primétine)*	83	92	94	87	75	25	V
TriOH-2',5,8 flavone*	77	85	94	87	40	05	V
MonoOH-5 monoOMe-6 flavone*	82	91	91	91	85	75	V
MonoOH-6 monoOMe-7 flavone*	83	87	90	86	80	35	Sa-c
MonoOH-7 monoOMe-4' flavone (pratol)	81	86	94	90	65	10	Éc
PentaOH-2',4',5,5',7 flavone (isoétine)*	39	45	78	70	10	00	Br

* Seules seront prises en compte dans le tableau 2 (caractéristiques spectrales) les structures marquées d'une astérisque.

† Whatman No. 1 (CP) avec: 1, AcOH-H₂O (6:4); 2, AcOH-H₂O-HCl (30:10:3); 3, *n*-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5 phase supérieure); 4, *t*-BuOH-AcOH-H₂O (3:1:1); Polyamide 11 F 254 Merck CCM, 5, C₆H₆-MeCOEt-MeOH (4:3:3); et 6, C₆H₆-Petrol-MeCOEt-MeOH (60:26:7).

‡ Bl, bleu; Br, brun; Éc, écru; J, jaune; R, rosé; Sa, Saumon; Ve, vert; V, violet; b, brillant; c, clair.

Tableau 2. Propriétés spectrophotométriques de 32 flavonols et de 23 flavones

	MeOH	NaOAc	NaOAc + H ₃ BO ₃	λ_{\max} (nm)* AlCl ₃	AlCl ₃ + HCl	NaOH
FLAVONOLS						
<i>Type myricétine</i>						
MonoMe-3 myricétine	256, (268), (306), 364	272, (322), 396	258, 382	272, (278), (312), 432	272, 312, (362), 407	268, 400 inst.
Méarnsétine	260, (320), 366	277, 310, 380	264, 369,	271, (310), 350, 427	271, (310), 350, 427	276, 318, 406
Syringétine	261, (324), 366	264, 382, 408	262, 366	272, (308), 350, 420	273, (310), 350, 420	268, 408
TriMe-3',4',7 myricétine	254, (264), (324), 365	260, 408	258, 366	273, (308), 354, 420	274, (307), 354, 422	268, 410
<i>Type quercétine</i>						
Géraldol	253, (308), 320, 364	(262), 320, (334), 371	(254), (306), 320, 361	(262), 272, 320, 424	268, 320, 422	(268), 320, 412
Tamarixétine	256, (270), (300), 368	(256), 276, (322), 382	256, (270), 370	266, (302), (360), 424	266, (300), (357), 425	274, (320), 404
Azaléatine	252, (272), 302, 364	273, 324, 392	258, (277), 380	270, 440	266, 428	270, 318, 402 inst.
DiMe-3,7 quercétine	258, (270), (300), 357	264, (300), 408	263, 378	276, (302), (340), 440	272, (300), 368, 404	264, (300), 408
Ombuine	256, (272), 368	266, 408	256, (272), 370	270, (304), (370), 426	268, (302), (362), 423	267, 410
TriMe-3,4',7 quercétine	256, (269), (300), 353	264, 358	256, (268), (292), 356	270, (300), 366, 403	268, (298), 360, 401	273, 386
TriMe-3',4',7 quercétine	254, (270), 368	(257), 264, 410	254, (270), 368	264, (300), (364), 424	262, (300), (360), 424	264, 407
TétraMe-3,3',4',7 quercétine	255, (268), 351	254, (269), 352	256, (268), 352	271, (299), 364, 402	270, 358, 402	254, 270, (330), 354, inst.
Quercétagétine	258, (272), 360	inst.	—	280, 322, 418	(272), 322, 395, (440)	inst.
DiMe-3,7 quercétagétine	238, 258, 278, 350	269, (360), 397	264, (284), 366	280, 300, 436	242, 268, 294, 381	270, (298), 390
Centaureïdine	256, (270), 348	274, (298), (322), 374	271, 356	268, (280), 378, (408)	266, (280), 370, (404)	(248), 272, (308), 388
TriMe-3,6,7 quercétagétine	258, (271), 353	266, (370), 410	264, 378	279, (302), 432	270, (280), (300), 380	269, (297), 408
Chrysosplénétine	256, (270), 350	264, (296), (358), 416	257, (269), 350	267, 280, 380, (400)	266, 376	266, (287), 412
Corniculatusine	258, (273), (331), 377	282, 329, 409	265, 396	(258), 275, (342), 463	269, (309), 365, 438	inst.
Limocitrine	258, (272), (336), 376	281, 325, 403	258, 274, 332, 380	270, 368, 438	268, 364, 438	282, 332, 426
<i>Type kaempférol</i>						
Désoxy-5 kaempférol	256, (307), 319, 355	263, (306), 318, 363	257, 320, 356		262, (270), (328), 415	333, 410
MonoMe-3 kaempférol	269, (300), (320), 350	277, 308, 390	268, 354	275, 305, 350, 396	276, 304, 347, 397	276, 326, 398
Rhamnocitrine	265, (292), (322), 365	262, 406	266, 364	272, (304), 354, 418	272, (304), 354, 418	238, 244, 269, 420
Ermanine	268, (300), (320), 348	278, (298), 374	268, (300), 352	278, 306, 350, 400	278, 305, 345, 398	277, (300), 372
DiMe-4',7 kaempférol	(256), 268, (324), 364	262, 404	267, (323), 365	271, (305), 350, 420	270, 350, 420	262, 408
TriMe-3,4',7 kaempférol	269, (300), (324), 348	270, (298), (320), 350	268, (294), (320), 348	276, 304, 348, 399	277, 303, 346, 398	270, (284), 350
MonoOMe-6 kaempférol	(257), 269, (334), 366	276, 310, 392	270, 370	271, 300, (368), 426	272, 300, 370, 428	276, 320, 414
MonoOMe-6 monoMe-3 kaempférol	271, 341	275, 310, 391	272, 350	280, 306, 366, (400)	284, 304, 360, (400)	275, 328, 400
Bétulétol	(255), 270, 336, 359	274, 298, 379	270, 298, 363	272, 300, 366, 424	272, 298, 362, 424	278, (350), 406

Tableau 2. *continued*

	MeOH	NaOAc	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})^*$ NaOAc + H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ + HCl	NaOH
Eupalitine	259, 271, (338), 364	266, 408	260, 268, (338), 364	270, 276, (380), 422	271, 276, 376, 423	252, 274, 420
MonoOMe-6, diMe-3,4' kaempférol	272, 338	274, 297, 368	272, (298), 346	282, (297), 360, (404)	282, (297), 357, (404)	272, (298), 372
Herbacétine	277, (310), 328, 386	inst.	—	295, 335, 370, 490	270, 280, 364, 445	inst.
<i>Type galangine</i>						
Datiscétine	262, (305), 358, (390)	276, 326, 396	266, 381	268, (300), 334, 408	268, (300), 332, 408	277, 327, 396
FLAVONES						
<i>Type lutéoline</i>						
DiMe-4',7 lutéoline	(244), 254, 268, 345	268, 334, (388)	254, 268, 346	266, 275, 360, 386	266, 275, 356, 384	268, (326), 380
MonoOH-6 lutéoline	(234), (245), 283, 349	(246), (302), 396	253, 289, 368	(250), 271, 306, 416	(238), 258, 296, 372	249, (306), (342), 391
MonoOMe-6 diMe-3',7 lutéoline	(240), (254), 276, 344	270, 408	(254), 274, 346	260, 284, 374	260, 286, 368	266, 404
Hypolaetine	255, 281, 342	(258), 294, 316, 384	265, 284, 361	(274), 296, (320), (336), 398, 440	261, 287, (306), 360	298, 385
<i>Type apigénine</i>						
MonoMe-5 apigénine	(254), 265, (300), 332	274, 312, 377	266, (300), 335	(254), 265, (302), 330, (404)	(256), 266, 304, 346, 404	272, 318, 380
Genkwanine	269, 336	256, 268, (300), 388	268, 338	276, 304, 348, 384	275, 301, 344, 382	254, 268, (300), 388
DiMe-4',7 apigénine	270, 330	269, 328	269, 330	278, 303, 344, 382	280, 304, 342, 384	272, 292, (326), (344)
Scutellaréine	284, 336	(264), (278), 302, 384	289, 344	304, 375	302, 361	(279), 308, 334, 384
Pectolarigénine	275, 331	276, (295), 367	276, (298), 336	(262), (294), 302, 356	(262), (294), 301, 351	276, (296), 370
Salvigénine	278, 330	277, 330	276, 332	(263), (292), 302, 356	(263), (292), 300, 353	316, (348), inst.
Isoscutellaréine	281, 305, (328), (364)	inst.	—	inst.	—	inst.
<i>Type chrysine</i>						
Wogonine	277, (320), (354)	(266), 284, 368	280, 350	(256), (288), 296, 334, 406	(256), (288), (294), 332, 406	(244), (268), 285, 374
MonoOMe-6 diMe-5,7 chrysine	(248), 266, 308	264, 306	264, 307	(248), 264, 308	(248), 264, 306	(244), 265, 308
DiOMe-6,8 diMe-5,7 chrysine	269, 304	270, 304	271, 305	272, 306	271, 304	272, 306
<i>Autres flavones</i>						
MonoOH-2' flavone	246, (290), 308, (330)	(252), 300, (336), 408	(250), (290), 304, (328)	246, (288), 306, (328)	248, (290), 310, 328	(252), 300, (310), 408
MonoOH-4' flavone	256, 325	(300), 309, 386	(256), 324	256, 324	256, 324	(232), (248), 310, 388
DiOH-2',5 flavone	268, 340	266, 339, 408	268, 341	(274), 288, 348, 385	(274), 288, 347, 388	262, 297, (330), 407
DiOH-5,6 flavone	283, (316), 363	289, (400)	283, 376	305, (332), (420)	305, (336), (424)	300, (420)
Primétine	280, (364)	282, (350)	280, (359)	(280), 308, (440)	(280), 308, (440)	285, 347
TriOH-2',5,8 flavone	277, 336	276, 335	276, 335	302, 337, 357	300, 336	257, 284, 342, 405
MonoOH-5 monoOMe-6 flavone	280, (310), 353	282, (400)	282, (320), 350	(275), 304, (330), 420	274, 302, (330), 420	282, (380)

Tableau 2. *continued*

	λ_{max} (nm)*					
	MeOH	NaOAc	NaOAc + H ₃ BO ₃	AlCl ₃	AlCl ₃ + HCl	NaOH
MonoOH-6 monoOMe-7 flavone	(245), 266, 309, (344)	266, (300), 390	266, 310, (344)	(246), 268, 310, (344)	(244), 270, 310, (346)	268, (320), 392
Isoméline	(256), 264, (288), 374	261, (313), 426	266, (292), (312), 397	270, (296), (334), 441	272, (295), (324), 408	262, (314), (434)

* Les spectres ont été réalisés à partir de solutions MeOH concentrées de flavonoïdes:

1ère série: *a*—0,2 à 0,5 ml de solution flavonique + 2 ml de MeOH fraîchement distillé (= MeOH); *b*—addition à la cuve *a* de NaOAc fondu broyé (conservé à l'étuve 120°), en excès (= NaOAc); et *c*—addition à la cuve *b* de 0,5 ml d'une solution aqueuse de H₃BO₃ à 5% (= NaOAc + H₃BO₃).

2ème série: *a*—0,2 à 0,5 ml de solution flavonique + 2 ml de solution MeOH de AlCl₃ à 0,6% (= AlCl₃); et *b*—addition à cuve *a* de 0,1 ml de HCl 6N (= AlCl₃ + HCl).

3ème série: 0,2 à 0,5 ml de solution flavonique + 2 ml de MeOH + 0,1 ml de solution aqueuse de NaOH 0,5 N. (= NaOH).

des C-glycoflavones. Celles-ci sont alors détectées après CP bidimensionnelle (BAW-AcOH 15%) soit par leur fluorescence, soit par leur couleur après pulvérisation de benzidine bisdiazotée ou de réactif de Bénédict [24].

Artéfacts inhérents au protocole expérimental. Il convient de mettre en garde le phytochimiste contre trois artéfacts pouvant résulter des techniques extractives et analytiques précédemment décrites. Le premier artéfact possible correspond aux produits de la réaction de transposition de Wessely et Moser [25]: isomérisation en milieu chlorhydrique à chaud des flavones 8-substituées en flavones 6-substituées; l'identification de ces dernières dans un extrait hydrolytique ne témoigne donc pas obligatoirement de leur caractère naturel; celui-ci sera vérifié par fractionnement à partir d'un extrait non hydrolysé.

Nous venons récemment de montrer [26] qu'au cours de l'hydrolyse chlorhydrique pouvaient se produire des réactions de condensation entre une unité C₁₅ flavonol (tel que quercétine ou kaempférol) et une unité C₆-C₃ cinnamique (tel que l'acide *p*-coumarique), conduisant à l'apparition de C-benzyl flavonoïdes. Ces composés sont facilement caractérisés sur CCM de polyamide par leur fluorescence de couleur jaune-ocre, et par la valeur de leur R_f en général supérieure à celle de l'aglycone flavonique correspondant.

Lorsque le matériel végétal contient des glucuronyl-flavonoïdes, composés particulièrement résistants à l'hydrolyse, on peut assister soit à la synthèse d'esters butyliques de glucuronyl flavones au cours de l'extraction par le *n*-BuOH, soit à la synthèse d'esters méthyliques à l'aide

du solvant d'élution au cours de la séparation sur colonne de polyamide [27].

PARTIE EXPERIMENTALE

Chromatographie sur couches minces de polyamide. La chromatographie exploratoire et la chromatographie de contrôle des fractions éluées de colonne sont pratiquées sur plaques Merck (DC-alufolien Polyamid 11 F 254); la migration est assurée par les mélanges solvant suivants: C₆H₆-MeCOEt-MeOH 6-1-3 ou 4-3-3; CHCl₃-MeOH-MeCOEt-Ac₂CH₃ 60-10-5-1 ou 20-10-5-1; C₆H₆-Petrol-MeCOEt-MeOH 60-26-7-7; les proportions données à titre indicatif, peuvent être adaptées au chimisme particulier de chaque échantillon. Lorsqu'au cours de l'ultime purification des composés isolés de colonne, il est fait appel à la chromatographie préparative sur CM de polyamide, seules sont alors employées les plaques confectionnées au laboratoire; dans ce cas, l'adsorbant est soit le MN-Polyamid-DC 11 (polyaminoundecansäure) de Macherey, Nagel & Co Germany ou, depuis l'arrêt de commercialisation de celui-ci, la poudre rylsan micronisée 34 B de A.T.O. Plastique France, soit le MN-Polyamid-DC 6 (polycaprolactam) de Macherey, Nagel & Co. Les systèmes solvant utilisés sont ceux précédemment cités. Après migration, la désorption des aglycones flavoniques est assurée par le MeOH.

Chromatographie sur colonne de polyamide. L'adsorbant, MN-Polyamid-SC 6 peut être utilisé soit directement sous sa forme commerciale, soit après décantations rapides dans le MeOH afin d'assurer une granulométrie plus homogène. Les aglycones flavoniques introduits au sommet de colonne sont élués par du C₆H₆ progressivement enrichi en MeCOEt puis en MeOH; l'ordre de désorption des flavonoïdes les plus courants est le suivant: C₆H₆-MeCOEt-MeOH: 100-00-00, polyméthoxyflavones (chrysosplénétine ou diOH-4',5 tétraOMe-3,3',6,7 flavone): 85-15-00, rhamnocitrine (Me-7 kaempférol), limocitrine (OMe-8 isorhamnétine): 80-15-05, rhamnétine (Me-7 quercétine), isorhamnétine (Me-3' quercétine), sexangularétine (OMe-8 kaempférol), apigénine (triOH-4',5,7 flavone): 70-20-10, kaempférol, scutellarétine (OH-6 apigénine), lutéoline (tétraOH-3',4',5,7 flavone), corniculatusine (OMe-8 quercétine): 60-25-15, quercétine, hypolaétine (OH-8 lutéoline): 40-35-25, myricétine (hexaOH-3,3',4',5,5',7 flavone), gossypétine (OH-8 quercétine).

Constantes chromatographiques et spectrophotométriques de quelques flavonoïdes. Le développement des techniques précédemment décrites nous a conduit à isoler à l'état cristallisé et à identifier un grand nombre de structures flavoniques. Le tableau 1 récapitule les caractéristiques chromatographiques de 86 flavonoïdes et le tableau 2 les propriétés spectrales de 55 d'entre eux; en effet, dans ce dernier tableau, seuls ont été pris en compte les composés non listés dans "The systematic Identification of Flavonoids" de Mabry *et al.* [22].

Remerciements—Nous remercions les chercheurs qui nous ont envoyé des flavonoïdes de référence et tout particulièrement le Dr. J. B. Harborne (University of Reading, G.B.) et le Dr. M. Chadenson (Université de Lyon, France).

BIBLIOGRAPHIE

1. Bate-Smith, E. C. (1954) *Biochem. J.* **58**, 122.
2. Bate-Smith, E. C. (1956) *Sc. Proc. Roy. Dublin Soc.* **27**, 165.
3. Bate-Smith, E. C. (1962) *J. Linn. Soc. London (Bot.)* **58**, 95.
4. Lebreton, P. (1962) Contribution à l'étude des flavonoïdes du Houblon et autres Urticales, Thèse Doc. Sc. Lyon.
5. Jay, M. (1969) Contribution biochimique à la connaissance taxinomique et phylogénétique des Saxifragacées et familles affines, Thèse Doc. Sc. Lyon.
6. Voirin, B. (1970) Recherches chimiques, taxinomiques et physiologiques sur les flavonoïdes des Ptéridophytes, Thèse Doc. Sc. Lyon.
7. Gonnet, J. F. (1974) Contribution de la biochimie flavonique à l'étude du complexe infraspécifique de l'*Anthyllis vulneraria* L. (Légumineuses), Thèse Doc. Spécialité Lyon.
8. Harborne, J. B. (1969) *Phytochemistry* **8**, 1449.
9. Harborne, J. B. et Williams, C. A. (1971) *Phytochemistry* **10**, 2727.
10. Lebreton, P., Jay, M. et Voirin, B. (1967) *Chim. Anal. Fr.* **49**, 375.
11. Harborne, J. B. (1973) in *Phytochemical Methods*, p. 33, Chapman and Hall, London.
12. Egger, K. (1961) *Z. Anal. Chem.* **182**, 161.
13. Egger, K. et Keil, M. (1965) *Z. Anal. Chem.* **210**, 201.
14. Gonnet, J. F. et Jay, M. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2313.
15. Wollenweber, E. et Egger, K. (1971) *Z. Pflanzenphysiol.* **65**, 427.
16. Pangon, J. F., Jay, M. et Voirin, B. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1883.
17. Jurd, L. (1962) in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (Geissman, T. A. éd.) p. 107, Pergamon Press, Oxford.
18. Markham, K. R. et Mabry, T. J. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1197.
19. Audier, H. (1966) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2892.
20. Kingston, D. G. I. (1971) *Tetrahedron* **27**, 2691.
21. Mabry, T. J., Kagan, J. et Rosler, H. (1965) *Phytochemistry* **4**, 177.
22. Mabry, T. J., Markham, K. R. et Thomas, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer-Verlag, New-York.
23. Combier, H. (1968) Recherches chimiques, taxinomiques et physiologiques sur les flavonoïdes des Crassulacées, Thèse Ing. Doc. Lyon.
24. Chopin, J. et Bouillant, M. L. (in press) *The Flavonoids* (Harborne, J. B. et Mabry, T. J. eds).
25. Wessely, F. et Moser, G. H. (1938) *Monatsch. Chem.* **56**, 97.
26. Jay, M., Voirin, B., Favre-Bonvin, J. et Gonnet, J. F. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1565.
27. Boutard, B., Bouillant, M. L., Chopin, J. et Lebreton, P. (1973) *Biochem. Systematics* **1**, 133.